

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 671 697

②1 N° d'enregistrement national :

92 00545

⑤1 Int Cl<sup>s</sup> : A 23 C 21/00, 9/146//A 61 K 37/02

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 20.01.92.

③0 Priorité : 21.01.91 JP 1911491.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 24.07.92 Bulletin 92/30.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SNOW BRAND MILK PRODUCTS Co., Ltd — JP.

⑦2 Inventeur(s) : Shimatani Masaharu, Uchida Yukio, Matsuno Ichirou, Sugawara Makihiro et Nakano Taku.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Nony & Cie.

⑤4 Procédé de fabrication d'une composition à teneur élevée en  $\alpha$ -lactalbumine.

⑤7 Procédé pour la préparation d'une composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -lactalbumine. Ce procédé comprend les étapes consistant à ajuster à un pH de 2-4 ou 5 ou plus, le petit lait de fromage, le petit lait de caséine acide ou le petit lait de caséine de la présure; à mettre en contact le petit lait avec un échangeur d'ions pour produire une solution ayant été soumise à l'échangeur; et ensuite, à concentrer et/ou soumettre à un dessalement la solution ayant été soumise à l'échangeur, le pH de la solution ayant été soumise à l'échangeur étant ajusté à 4 ou moins si nécessaire. Selon le procédé, il est possible de produire de manière efficace une composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -lactalbumine, à un faible coût et d'une manière simple et facile, à l'échelle industrielle. La composition résultante, ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -lactalbumine, peut être utilisée comme produit alimentaire ou comme produit pharmaceutique.

BEST AVAILABLE COPY

FR 2 671 697 - A1



5

10           **PROCEDE DE FABRICATION D'UNE COMPOSITION A TENEUR  
                  ELEVÉE EN  $\alpha$ -LACTALBUMINE**

La présente invention a pour objet un procédé de fabrication d'une composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -lactalbumine provenant du petit lait.

15           Etant donné que la protéine du petit lait présente une valeur nutritive et une aptitude d'utilisation élevées, comparée à la caséine et aux protéines du soja, on sait que la protéine du petit lait est utilisée comme produit de substitution pour le lait maternel ou  
20           comme source de protéine pour des compositions nutritives. En particulier, la  $\beta$ -lactoglobuline (désignée ci-après par " $\beta$ -Lg"), qui est un des principaux composants du petit lait, n'est pas présente dans le lait maternel et agit comme allergène dans les allergies infantiles. En conséquence, lorsqu'une protéine du petit lait est  
25           utilisée pour remplacer le lait maternel, il est recommandé de réduire la  $\beta$ -Lg ou d'utiliser une substance ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -lactalbumine (désignée ci-après par " $\alpha$ -La").

Jusqu'à ce jour le petit lait, obtenu comme produit secondaire dans la fabrication de fromage ou de caséine, est utilisé dans l'alimentation telle quelle ou bien sous des formes variées, par  
30           exemple sous la forme d'un petit lait à faible teneur en lactose, le lactose étant éliminé du petit lait, sous la forme de petit lait déssalé obtenus par traitement à l'aide de divers dispositifs, ou sous la forme d'un condensat de protéine de petit lait (désigné ci-après par " $\text{CPP}$ ") produit par traitement du petit lait par ultrafiltration.  
35           D'autre part, comme procédé de fractionnement des protéines du petit lait contenues dans le petit lait en composants individuels, il a

été proposé un procédé pour réduire la  $\beta$ -Lg ou un procédé pour fabriquer une composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -La.

Comme procédé de séparation et de récupération d'une fraction ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -La, il a été proposé divers  
5 procédés tels que ceux décrits par Kuwata et al. (J. Food Sci., 50 (1985), R.J. Pearce (Aust. J. Dairy Technol., 42 (1987) et J.L. Maubois et al. (demande de brevet japonais non examiné publié (désigné ci-après par "J.P. Kokai") Sho n° 56-36494). Ces  
10 procédés utilisent le petit lait comme produit de départ et exploitent la différence entre les propriétés physiques et/ou chimiques des divers types de protéine du petit lait. Toutefois, ces procédés présentent divers inconvénients constitués par la complexité de leurs étapes ; leur consommation élevée en énergie ; leur faible rendement ; et le fait qu'ils provoquent des  
15 modifications irréversibles des protéines. En conséquence, ils ne sont pas acceptés comme étant des procédés praticables à l'échelle industrielle.

Comme procédé pour la récupération des protéines du petit lait à une concentration élevée, il a été proposé des procédés  
20 utilisant un échangeur d'ions, comme décrit par J.N. de Wit et al. (Neth. Milk Dairy J. 40 (1986)) et J.S. Ayers et al. (New Zealand J. Dairy Sci. and Tech., 21 (1986)). Toutefois, dans ces procédés, la plus grande partie de la solution ayant été soumise à l'échangeur d'ions (désignée ci-après par "solution ayant été soumise à  
25 l'échangeur"), comme produit secondaire, est simplement utilisée pour la préparation de lactose, et il n'a pas été proposé de procédé pour utiliser extensivement les protéines du petit lait contenues dans la solution ayant été soumise à l'échangeur d'ions.

L'objet de la présente invention est de fournir un procédé  
30 pour la séparation et la récupération efficaces de l' $\alpha$ -La à partir du petit lait de fromage, du petit lait de caséine acide ou du petit lait de caséine de la présure.

Les présents inventeurs ont effectué des recherches approfondies pour atteindre l'objectif ci-dessus et ont découvert  
35 que cet objectif pouvait être atteint, par ajustement du petit lait de fromage, du petit lait de caséine acide ou du petit lait de caséine de la présure à un pH de 2-4 ou 5 ou plus, par mise en contact du petit

lait avec un échangeur d'ions pour produire une solution ayant été soumise à l'échangeur d'ions ; et ensuite, par concentration et/ou dessalement de la solution ayant été soumise à l'échangeur, si nécessaire, après ajustement du pH de la solution ayant été soumise à l'échangeur à une valeur de 4 ou moins. De préférence, la solution ayant été soumise à l'échangeur est concentrée et cristallisée pour éliminer le lactose. De préférence encore, la solution ayant été soumise à l'échangeur est séchée et transformée en poudre pour produire une composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -La. De plus, il est préférable que la solution ayant été soumise à l'échangeur, et/ou une liqueur mère après élimination du lactose, soit ajustée à un pH inférieur à 4 et ensuite, soumise à une ultrafiltration, à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant une masse moléculaire d'exclusion de 10 000 à 50 000 daltons, pour éliminer la teneur en lactose et en cendres tout en éliminant de façon efficace le glycomacropéptide de  $\kappa$ -caséine (désigné ci-après par "GMP") contenu dans le petit lait du fromage, ce qui permet d'élever la teneur en  $\alpha$ -La.

Le petit lait tel que le petit lait du fromage, le petit lait de la caséine acide ou le petit lait de la caséine de présure, utilisable comme produit de départ de la présente invention, est un produit secondaire obtenu lors de la séparation du fromage, de la caséine acide ou de la caséine de présure d'avec un lait tel que le lait de vache, le lait de chèvre et le lait de brebis. Du fait que de faibles quantités de caillebotte ou de graisse restent souvent dans le petit lait, il est préférable de les éliminer préalablement à l'aide d'un séparateur de crème ou d'un clarificateur. Afin que les protéines du petit lait telles la  $\beta$ -Lg soient adsorbées de façon efficace sur un échangeur d'ions, le petit lait doit être préalablement concentré à l'aide d'un dispositif d'ultrafiltration. De plus, le petit lait peut être préalablement dessalé à l'aide d'un dialyseur électrique et/ou d'une résine échangeuse d'ions.

Comme échangeur d'ions, on peut utiliser tout type d'échangeurs d'ions, y compris les échangeurs d'ions minéraux et les échangeurs d'ions organiques, comprenant les échangeurs anioniques ou les échangeurs cationiques. Les échangeurs anioniques ou les échangeurs cationiques sont utilisés en fonction

du pH du petit lait. Dans le cas où l'on utilise des échangeurs anioniques, le pH est ajusté à 5 ou plus. Comme produit pour ajuster le pH, on peut utiliser toutes sortes de substances. Par exemple, on peut utiliser des alcalis tels que l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de calcium, le carbonate de potassium, le citrate de sodium, etc. Selon une variante, le petit lait dessalé, qui a été dessalé à l'aide d'une résine échangeuse d'ions et qui présente un pH d'environ 5 à 12, peut être utilisé pour ajuster le pH. Dans le petit lait dont le pH a été ajusté à 5 ou plus, la plus grande partie des protéines du petit lait est chargée négativement. Lorsque ce petit lait est mis en contact avec un échangeur anionique, la  $\beta$ -Lg, un des principaux composants, est adsorbé sélectivement sur l'échangeur d'ions, par rapport à l' $\alpha$ -La. Il en résulte que l' $\alpha$ -La et une partie du GMP sont récupérées séparément sous la forme d'une solution ayant été soumise à l'échangeur.

Dans le cas où l'on utilise un échangeur cationique, le pH du petit lait est ajusté à une valeur de 2 à 4. Comme substance permettant d'ajuster le pH, on peut utiliser n'importe quel type de substance. Par exemple, on peut prendre un acide tel que l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique, l'acide lactique et l'acide citrique. Le petit lait dessalé, qui a été dessalé à pH d'environ 1 à 4, peut être utilisé pour ajuster le pH. Dans le petit lait dont le pH a été ajusté à une valeur de 2 à 4, la plus grande partie des protéines du petit lait est chargée positivement, alors que le GMP est chargé négativement. Lorsque ce petit lait est mis en contact avec un échangeur cationique, la  $\beta$ -Lg, qui est un des principaux composants, est adsorbée sélectivement sur l'échangeur d'ions, comparée à la  $\alpha$ -La. En conséquence, l' $\alpha$ -La et la plus grande partie du GMP sont récupérées séparément sous forme de solution ayant été soumise à l'échangeur.

Comme techniques provoquant l'adsorption des protéines du petit lait sur l'échangeur d'ions, il existe des techniques connues telles que celles décrites par J.N. de Wit et al. et J.S. Ayers et al., comme mentionné ci-dessus. Ces techniques utilisent un échangeur d'ions ayant un groupe échangeur d'ions tel qu'un groupe méthylammonium quaternaire (MAQ) ou un groupe diéthylaminoéthyle, et un échangeur cationique ayant un groupe

échangeur tel qu'un groupe carboxyméthyle ou un groupe sulfonate. Ces techniques sont utilisées pour préparer les protéines du petit lait isolées (PPI) en provoquant l'adsorption des protéines du petit lait sur un échangeur d'ions. Dans ces techniques, la solution ayant été soumise à l'échangeur est utilisée simplement comme petit lait déprotéiné pour préparer le lactose. De plus, on ne prend pas en considération l'utilisation efficace de l' $\alpha$ -La dans la solution ayant été soumise à l'échangeur d'ions. Les présents inventeurs ont découvert que lorsqu'on fait passer le petit lait sur un échangeur d'ions après que son pH ait été ajusté, l' $\alpha$ -La est contenue dans la solution ayant été soumise à l'échangeur et est séparée et récupérée de façon efficace. La solution ayant été soumise à l'échangeur ainsi obtenue peut être utilisée telle quelle comme composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -La. Selon une variante, la solution peut être concentrée et/ou dessalée ou, si nécessaire, séchée et transformée en poudre. De plus, la solution ayant été soumise à l'échangeur peut être concentrée et cristallisée pour éliminer le lactose et former une liqueur mère, qui peut être alors utilisée comme composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -La. La concentration peut être effectuée dans un évaporateur. La cristallisation peut être réalisée par refroidissement ou par addition d'un germe de cristal. Afin d'obtenir une composition ayant une teneur en  $\alpha$ -La bien plus élevée, il est préférable qu'avant la concentration ou le dessalement de la solution ayant été soumise à l'échangeur ou de la liqueur mère ou d'un mélange de ces produits, le pH soit ajusté à une valeur de 4 ou moins. La concentration peut être réalisée sous vide ou par ultrafiltration. Le dessalement peut être réalisé par dialyse électrique, échange d'ions, ultrafiltration ou diafiltration. La diafiltration est une technique permettant d'élever encore la teneur en protéines, dans laquelle le liquide, qui a été concentré dans une certaine mesure, est soumis à une ultrafiltration tandis que de l'eau est ajoutée simultanément et que la solution ayant été soumise est soutirée. Il est préférable que l'ultrafiltration soit réalisée à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant une masse moléculaire d'exclusion de 10 000 à 50 000 daltons. Lorsque la masse moléculaire d'exclusion de la membrane d'ultrafiltration est inférieure à 10 000 daltons, il devient difficile

de faire passer et de fractionner le GMP. Lorsque la masse moléculaire d'exclusion de la membrane d'ultrafiltration est supérieure à 50 000 daltons, l' $\alpha$ -La passe conjointement avec le GMP et en conséquence, il est pratiquement difficile de conduire le fractionnement. En d'autres termes, le GMP est présent sous forme de monomère (MM: 9 000) à un pH de 4 ou moins, alors qu'il est présent sous forme de polymère (MM: 40 000 à 50 000) à un pH supérieur à 4. En conséquence, il est préférable d'utiliser une membrane d'ultrafiltration ayant une masse moléculaire d'exclusion dans la gamme mentionnée ci-dessus afin d'éliminer de façon efficace le GMP à partir de la solution ayant été soumise à l'échangeur et élever ainsi la teneur en  $\alpha$ -La.

Selon la présente invention, il est possible de produire une composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -La à un faible coût et d'une manière simple à l'échelle industrielle, par mise en contact du petit lait avec un échangeur d'ions après ajustement du pH du petit lait. La composition à teneur élevée en  $\alpha$ -La ainsi obtenue peut être utilisée à l'échelle industrielle comme produit alimentaire ou produit médicinal et en conséquence, c'est une composition très utile.

### EXEMPLES

La présente invention sera mieux comprise en se référant aux exemples non limitatifs ci-après.

#### EXEMPLE DE REFERENCE 1

Cent kilogrammes de petit lait de cheddar, dont le pH a été ajusté à 3,5 par de l'acide chlorhydrique, sont mélangés avec 3 litres d'Indion S3 fournis par Phoenix Chemicals (Sulfopropylcellulose, carboxyméthylcellulose) comme échangeur cationique, agités lentement pendant 20 heures et ensuite, séparés à l'aide d'un filtre en une solution ayant été soumise à l'échangeur et en l'échangeur cationique. La solution ayant été soumise à l'échangeur ainsi obtenue (99,2 kg) contient 5,5 g/100 g de substances solides, 0,6 g/100 g de protéine et 0,2 g/100 g d' $\alpha$ -La.

L' $\alpha$ -La est déterminée quantitativement par électrophorèse (méthode de Laemmli) comme décrit par Laemmli V. K. ; dans Nature, 227, 680 (1970).

#### 5 EXEMPLE DE REFERENCE 2

On fait passer 100 kg de petit lait de caséine de la présure, dont le pH a été ajusté à 6,5 à l'aide d'hydroxyde de sodium, sur une colonne chargée avec 4 litres de Sepharosil MAQ (Silica-MAQ) fabriquée par Rhône Poulenc, en tant qu'échangeur anionique, à une SV de 2,5 pendant 10 heures. La solution ayant été soumise à l'échangeur (99,0 kg) contient 5,8 g/100 g de substances solides, 0,7 g/100 g de protéine et 0,4 g/100 g d' $\alpha$ -La.

#### 15 EXEMPLE DE REFERENCE 3

La solution ayant été soumise à l'échangeur, obtenue dans l'exemple de référence 1, est concentrée jusqu'à une teneur en substances solides de 60 %, à l'aide d'un évaporateur, et ensuite cristallisée pour éliminer le lactose. La liqueur mère (6,4 kg), obtenue après lavage à l'eau du lactose cristallisé, contient 35,0 g/100 g de substances solides, 9,0 g/100 g de protéine et 2,8 g/100 g d' $\alpha$ -La.

#### 25 EXEMPLE DE REFERENCE 4

La solution ayant été soumise à l'échangeur, obtenue dans l'exemple de référence 2, est concentrée jusqu'à une teneur en substances solides de 55 %, à l'aide d'un évaporateur, et ensuite, elle est cristallisée pour éliminer le lactose. La liqueur mère (8,6 kg) obtenue, après lavage à l'eau du lactose cristallisé, contient 40,0 g/100 g de substances solides, 8,0 g/100 g de protéine et 4,5 g/100 g d' $\alpha$ -La.



**EXEMPLE 1**

Le pH de la solution ayant été soumise à l'échangeur, obtenue dans l'exemple de référence 2, est ajusté à 3,4 à l'aide d'acide chlorhydrique et la solution est ensuite soumise à une ultrafiltration à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant une masse moléculaire d'exclusion de 20 000 daltons. La solution concentrée résultante est ensuite soumise à un dessalement par diafiltration. La solution dessalée et concentrée résultante (8 kg) contient 11,5 g/100 g de substances solides, 8,5 g/100 g de protéine et 4,2 g/100 g d' $\alpha$ -La. Cette solution est encore concentrée puis séchée de manière classique pour donner 0,90 kg de poudre.

**EXEMPLE 2**

5,6 kg d'eau sont ajoutés à la liqueur mère obtenue dans l'exemple de référence 3. Le pH du mélange résultant est ajusté à 3,8 à l'aide d'acide citrique et ensuite, le mélange est soumis à une ultrafiltration à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant une masse moléculaire d'exclusion de 10.000 daltons. La solution concentrée obtenue est soumise à un dessalement par diafiltration. La solution dessalée et concentrée obtenue (5 kg) contient 7,9 g/100 g de substances solides, 6,0 g/100 g de protéine, et 3,5 g/100 g d' $\alpha$ -La. Cette solution est encore concentrée puis séchée selon des méthodes connues pour donner 400 g de poudre.

**EXEMPLE 3**

Le pH de la solution ayant été soumise à l'échangeur, obtenue dans l'exemple de référence 2, est ajusté à 6,4 à l'aide de NaOH et ensuite, la solution est soumise à une ultrafiltration à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant une masse moléculaire d'exclusion de 50 000 daltons. La solution concentrée résultante est ensuite soumise à un dessalement par diafiltration, à l'aide de la même membrane d'ultrafiltration. La solution dessalée et concentrée obtenue (10 kg) contient 15,0 g/100 g de substances solides,

5,5 g/100 g de protéine et 1,9 g/100 g d' $\alpha$ -La. Cette solution est encore concentrée puis séchée de manière classique pour donner 1,45 kg de poudre.

#### 5 EXEMPLE 4

5,6 kg d'eau sont ajoutés à la liqueur mère obtenue dans l'exemple de référence 4. Le mélange résultant est soumis à une ultrafiltration à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant une  
10 masse moléculaire d'exclusion de 2 000 daltons. La solution concentrée résultante est soumise à un dessalement par diafiltration à l'aide de la même membrane d'ultrafiltration. La solution dessalée et concentrée résultante (8 kg) contient  
15 16,7 g/100 g de substances solides, 10,0 g/100 g de protéine, et 6,2 g/100 g d' $\alpha$ -La. Cette solution est encore concentrée puis séchée de manière classique pour donner 900 g de poudre.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la préparation d'une composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -lactalbumine, comprenant les étapes  
5 consistant à :

(a) ajuster le pH du petit lait de fromage, du petit lait de caséine acide ou du petit lait de caséine de présure à une valeur de  
10 5 ou plus ;

(b) mettre en contact le petit lait avec un échangeur anionique pour produire une solution ayant été soumise à l'échangeur ;

15 (c) ajuster le pH de la solution ayant été soumise à l'échangeur à une valeur de 4 ou moins ; et ensuite

(d) concentrer et/ou dessaler la solution ayant été soumise à l'échangeur.

20

2. Procédé selon la revendication 1, comprenant en outre une étape consistant à concentrer et cristalliser la solution ayant été soumise à l'échangeur, provenant de l'étape (b), pour en éliminer le lactose, et produire une liqueur mère.

25

3. Procédé selon la revendication 2, comprenant en outre une étape consistant à ajouter de l'eau à la liqueur mère pour préparer une liqueur mère diluée, et à utiliser la liqueur mère diluée comme la solution ayant été soumise à l'échangeur de  
30 l'étape (c).

4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel, dans l'étape (d), la solution ayant été soumise à l'échangeur est soumise à un dessalement par diafiltration à l'aide d'une membrane  
35 d'ultrafiltration ayant une masse moléculaire d'exclusion de 10 000 - 50 000 daltons.

5. Procédé selon la revendication 1, comprenant en outre une étape consistant à sécher et à transformer en poudre la solution ayant été soumise à l'échangeur de l'étape (d).

5 6. Procédé pour la préparation d'une composition ayant une teneur élevée en  $\alpha$ -lactalbumine, comprenant les étapes consistant à :

10 (a) ajuster le pH du petit lait de fromage, du petit lait de caséine acide ou du petit lait de caséine de la présure à une valeur de 2-4 ;

15 (b) mettre en contact le petit lait avec un échangeur cationique pour produire une solution ayant été soumise à l'échangeur ;

(c) ajuster le pH de la solution ayant été soumise à l'échangeur à une valeur de 4 ou moins ; et ensuite

20 (d) concentrer et/ou dessaler la solution ayant été soumise à l'échangeur.

7. Procédé selon la revendication 6, comprenant en outre une étape consistant à sécher et à transformer en poudre la solution  
25 ayant été soumise à l'échangeur de l'étape (c).

8. Procédé selon la revendication 6, comprenant en outre une étape consistant à concentrer et cristalliser la solution ayant été soumise à l'échangeur après l'étape (b) et avant l'étape (c), afin  
30 d'en éliminer le lactose et produire une liqueur mère.

9. Procédé selon la revendication 8, comprenant en outre une étape consistant à ajouter de l'eau à la liqueur mère pour préparer une liqueur mère diluée et ensuite, à utiliser la liqueur  
35 mère diluée comme la solution ayant été soumise à l'échangeur de l'étape (c).

10. Procédé selon la revendication 6, dans lequel, dans l'étape (c), la solution ayant été soumise à l'échangeur est soumise à un dessalement par diafiltration à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant une masse moléculaire d'exclusion de 5 10 000 - 50 000 daltons.